

EP/EP99 / 09842

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 25 JAN 2000  
WIPO PCT

EP 99/9842  
**Bescheinigung**

Die Merck Patent GmbH in Darmstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

"Inhibitoren des Integrins  $\alpha_v\beta_6$ "

am 19. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. September 1999  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

im Auftrag

Hiebinger

Aktenzeichen: 198 58 857.7



A 9161  
06.90  
11/98  
GPO/DPV

**BEST AVAILABLE COPY**

**Merck Patent Gesellschaft  
mit beschränkter Haftung**

**64271 Darmstadt**

**Inhibitoren des Integrins  $\alpha_v\beta_6$**

## Inhibitoren des Integrins $\alpha_v\beta_6$

Die Erfindung beschreibt neuartige Peptide, welche als Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_6$  biologisch wirksam sind. Diese Peptide weisen alle ein gemeinsames 5 Strukturmotiv, nämlich – **Asp Leu Xaa Xaa Leu** – , bzw. in einer bevorzugten Form – **Arg Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu Arg** – auf, wobei Xaa für einen beliebigen Aminosäurerest steht. Die erfindungsgemäßen Peptide können als wirksame Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_6$  Integrin-Rezeptors und somit zur Behandlung verschiedener Krankheiten und pathologischer Befunde eingesetzt werden.

10 Integrine gehören zu der Familie von heterodimeren Klasse I – Transmembran-Rezeptoren, die in zahlreichen Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell- Adhäsionsvorgängen eine wichtige Rolle spielen (Tuckwell et al., 1996, Symp. Soc. Exp. Biol. 47). Sie können grob in drei Klassen eingeteilt werden: die  $\beta_1$ -Integrine, die Rezeptoren 15 für die extrazelluläre Matrix darstellen, die  $\beta_2$ -Integrine, welche auf Leukozyten aktivierbar sind und während inflammatorischen Prozessen "getriggert" werden, sowie die  $\alpha_v$ -Integrine, die die Zellantwort bei Wundheilungs- und anderen pathologischen Prozessen beeinflussen (Marshall and Hart, 1996, Semin. Cancer Biol. 7, 191).

20 Die Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_6$  binden alle an die Arg-Gly-Asp (RGD) Peptidsequenz, z.B. im natürlichen Liganden Fibronectin. Lösliche RGD-haltige Peptide vermögen die Interaktion jedes dieser Integrine mit Fibronectin zu inhibieren.  $\alpha_v\beta_6$  ist ein relativ seltes Integrin (Busk et al., 1992 J. Biol. Chem. 267(9), 5790), das bei Reperaturvorgängen in Epithelgewebe vermehrt gebildet wird und die natürlichen Matrixmoleküle Fibronectin und Tenascin bevorzugt bindet (Wang et al., 1996, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15(5), 664). Die physiologischen und pathologischen Funktionen von  $\alpha_v\beta_6$  sind noch nicht genau bekannt, es wird jedoch vermutet, daß dieses Integrin bei physiologischen 25 Vorgängen und Erkrankungen (z. B. Entzündungen, Wundheilung, Tumore), bei denen epitheliale Zellen beteiligt sind, eine wichtige Rolle spielt. So wird  $\alpha_v\beta_6$  auf Keratinozyten in Wunden exprimiert (Haapasalmi et al., 1996, J. Invest. Dermatol. 106(1), 42), woraus anzunehmen ist, daß neben Wundheilungsprozessen und 30

Entzündungen auch andere pathologische Ereignisse der Haut, wie z. B. Psoriasis, durch Agonisten oder Antagonisten des besagten Integrins beeinflußbar sind. Ferner spielt  $\alpha_v\beta_6$  im Atemwegsepithel eine Rolle (Weinacker et al., 1995, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12(5), 547), so daß entsprechende 5 Agonisten / Antagonisten dieses Integrins bei Atemwegserkrankungen, wie Bronchitis, Asthma, Lungenfibrosen und Atemwegstumoren erfolgreich eingesetzt werden könnten. Letztlich ist bekannt, daß  $\alpha_v\beta_6$  auch im Darmepithel eine Rolle spielt, so daß entsprechende Integrin-Agonisten/-Antagonisten bei der Behandlung von Entzündungen, Tumoren und Wunden des Magen/Darmtraktes 10 Verwendung finden könnten.

Bislang ist noch kein niedermolekularer Inhibitor gefunden worden, der selektiv an das  $\alpha_v\beta_6$  –Integrin bindet. Es bestand somit die Aufgabe, neben den bisher bekannten natürlichen hochmolekularen Liganden und Antikörpern, die 15 therapeutisch und diagnostisch schwer handhabbar sind, potente, spezifische bzw. selektive niedermolekulare Liganden für  $\alpha_v\beta_6$ , vorzugsweise Peptide, zu finden, die für die genannten therapeutischen Gebiete aber auch als Diagnostikum oder Reagenz verwendet werden können.

20 Es wurde gefunden, daß die peptidischen Verbindungen der unten dargelegten Formeln und ihre Salze als lösliche Moleküle Wirkung auf Zellen ausüben, die den genannten Rezeptor tragen, oder wenn sie an Oberflächen gebunden sind, künstliche Liganden für die  $\alpha_v\beta_6$  – vermittelte Zellhaftung darstellen. Vor allem wirken sie als  $\alpha_v\beta_6$  Integrin-Inhibitoren, wobei sie insbesondere die 25 Wechselwirkungen des Rezeptors mit anderen Liganden hemmen, wie z. B. die Bindung von Fibronectin. Diese Wirkung kann z.B. nach der Methode nachgewiesen werden, die von J.W. Smith et al. in J. Biol. Chem. 265, 12267-12271 (1990) beschrieben wird.  
Die Abhängigkeit der Entstehung von Angiogenese von der Wechselwirkung 30 zwischen vaskulären Integrinen und extrazellulären Matrixproteinen ist von P.C. Brooks, R.A. Clark und D.A. Cheresh in Science 264, 569-71 (1994) beschrieben.

Weiter wurde gefunden, daß die neuen Substanzen bei guter Verträglichkeit sehr wertvolle pharmakologische Eigenschaften besitzen und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Dies wird weiter unten genauer beschrieben.

5 Die erfindungsgemäßen peptidischen Verbindungen können ferner als Diagnostika zur Detektion und Lokalisierung von pathologischen Zuständen im epithelialen System *in vivo* verwendet werden, wenn sie mit entsprechenden Markern (z.B. dem Biotinylrest) nach dem Stand der Technik ausgestattet sind. Die Erfindung umfaßt auch Konjugate mit anderen Wirkstoffen, wie zytotoxischen  
10 Wirkstoffen sowie Konjugate mit Radiomarkern für Röntgentherapie oder PET Diagnose aber auch Fusionsproteine mit Markerproteinen wie GFP oder Antikörpern, oder therapeutischen Proteinen wie IL-2.  
Gegenstand der Erfindung sind somit peptidische Verbindungen  
der Formel I

15



I

worin bedeuten:

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup>, X<sup>6</sup> jeweils unabhängig voneinander einen  
20 Aminosäurerest, wobei die Aminosäuren unabhängig voneinander ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, Phe, His, Ile, Leu, Lys, Met, Nle, homo-Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr oder Val, und die genannten Aminosäuren auch derivatisiert sein können,

W<sup>2</sup> ausgewählt aus der Gruppe OH, OR, NHR, NR<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>,,

25 W1 H oder Acylrest

R Alkyl mit 1-6 C-Atomen und

n, m jeweils unabhängig voneinander eine Zahl von 0 – 15. In den  
30 Fällen, in denen m bzw. n einen Wert größer als 1 annimmt, können die Reste X<sup>1</sup> bzw. X<sup>6</sup> jeweils unabhängig voneinander gleich oder verschieden sein.

Erfindungsgemäß sind auch solche Aminosäuren bzw. Aminosäurereste mit umfaßt, welche ausgehend von den natürlichen Aminosäuren, derivatisiert sind, Homologe oder Isomere derselben sind. Die Aminosäurereste sind üblicherweise über ihre alpha-Amino- und alpha-Carboxygruppen miteinander verknüpft

5 (Peptidbindung).

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin in bevorzugter Weise solche peptidische Verbindungen, worin  $X^2$  einen Aminosäurerest darstellt, der ausgewählt wurde aus der Gruppe Thr, Ser, Asp oder Glycin, ferner solche

10 peptidische Verbindungen, worin  $X^3$  ein Aminosäurerest ist, der ausgewählt wurde aus der Gruppe Asp, Glu, Arg, Lys, His oder Tyr, und schließlich solche peptidische Verbindungen, worin  $X^4$  ein Aminosäurerest ist, der ausgewählt wurde aus der Gruppe Ser, Tyr, Thr, Gly oder Val.

15 Unter die bevorzugten Verbindungen (Bedeutungen bzw. Abkürzungen siehe oben und unten) fallen also solche der allgemeinen Formel II

$W^1 — X^1_n Arg Thr Asp Leu X^3 X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIa,

$W^1 — X^1_n Arg Ser Asp Leu X^3 X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIb,

20  $W^1 — X^1_n Arg Asp Asp Leu X^3 X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIc,

$W^1 — X^1_n Arg Ser Asp Leu X^3 X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIId,

$W^1 — X^1_n Arg Gly Asp Leu X^3 X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIle,

sowie solche der allgemeinen Formel III

25  $W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu Asp X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIIa,

$W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu Glu X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIIb,

$W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu Arg X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIIc,

$W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu Lys X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIId,

$W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu His X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIIe,

30  $W^1 — X^1_n Arg X^2 Asp Leu Tyr X^4 Leu Arg X^6_m — W^2$  IIIf,

sowie solche der allgemeinen Formel IV

W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg X<sup>2</sup> Asp Leu X<sup>3</sup> Ser Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> IVa,  
W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg X<sup>2</sup> Asp Leu X<sup>3</sup> Tyr Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> IVb,  
W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg X<sup>2</sup> Asp Leu X<sup>3</sup> Thr Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> IVc,  
W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg X<sup>2</sup> Asp Leu X<sup>3</sup> Gly Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> IVd,  
5 W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg X<sup>2</sup> Asp Leu X<sup>3</sup> Val Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> IVe.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße peptidische Verbindungen sind die der Formel V

10 W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg Thr Asp Leu Asp Ser Leu Arg X<sup>6</sup><sub>m</sub> — W<sup>2</sup> V,

und hierbei insbesondere die der Formel VI

W<sup>1</sup> — X<sup>1</sup><sub>n</sub> Arg Thr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Thr X<sup>6</sup><sub>m-1</sub> — W<sup>2</sup> VI.

15 Schließlich sind die folgenden Einzelverbindungen besonders bevorzugt, wobei auch solche eingeschlossen sind, die an den N- und C-Termini modifiziert sind:

(a) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-Tyr-Thr-Leu-OH  
20 (b) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-OH  
(c) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-OH  
(d) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>  
(e) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-OH  
(f) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>  
25 (g) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Tyr-Tyr-Leu-Arg-Thr-Tyr-OH  
(h) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

30 Ala A Alanin  
Asn N Asparagin  
Asp D Asparaginsäure  
Arg R Arginin

Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
5	His	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
10	Nle	Norleucin
Orn		Ornithin
Phe	F	Phenylalanin
Phg		Phenylglycin
Pro	P	Prolin
15	Ser	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

20

Sofern die vorstehend genannten Aminosäuren in mehreren enantiomeren Formen auftreten können, so sind vor- und nachstehend, z. B. als Bestandteil der Verbindungen der Formel I-VI, alle diese Formen und auch ihre Gemische eingeschlossen. Ferner können die Aminosäuren, z. B. als Bestandteil von  
25 Verbindungen der Formel I-VI, mit entsprechenden an sich bekannten Schutzgruppen versehen sein.  
Die Verbindungen der Formel I – VI können ein oder mehrere chirale Zentren besitzen und daher in verschiedenen stereoisomeren Formen vorkommen. Die angegebenen Formeln umschließen alle diese Formen, insbesondere die D- und  
30 L-Formen und zwar sowohl in enantiomeren als auch in racemischen Gemischen. Schließlich umfassen die oben und unten genannten Formeln I und II auch erfindungsgemäß die entsprechenden Salze, insbesondere die entsprechenden physiologisch unbedenklichen Salze.

In die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch sogenannte Prodrug-Derivate eingeschlossen, d. h. mit z. B. Alkyl- oder Acylgruppen, Zuckern oder Oligopeptiden abgewandelte Verbindungen der Formel I, die im Organismus rasch zu den wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen gespalten werden.

- 5     Ferner sind in die erfindungsgemäßen Verbindungen auch Derivate mit eingeschlossen, welche aus den eigentlichen erfindungs-gemäßen Peptiden und bekannten Marker-Verbindungen bestehen, die es ermöglichen, die Peptide leicht nachzuweisen. Beispiele für solche Derivate sind biotinylierte oder fluoreszenzmarkierte Peptide.
- 10    Im allgemeinen sind die erfindungsgemäßen Peptide linear, sie können aber auch zyklisiert werden. Die Erfindung umfaßt nicht nur die genannten Peptide der Formeln I bis VI sondern auch Mischungen und Zubereitungen, welche neben diesen erfindungsgemäßen Verbindungen auch andere pharmakologische Wirkstoffe oder Adjuvantien enthalten, die die primäre pharmakologische Wirkung
- 15    der erfindungsgemäßen Peptide in gewünschter Weise beeinflussen können.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen und auch die Ausgangsstoffe zu ihrer Herstellung werden im übrigen nach an sich bekannten und häufig eingesetzten Methoden hergestellt, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie

- 20    Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart;) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von an sich bekannten Varianten Gebrauch machen.

- 25    Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Peptide mittels Festphasensynthese und nachfolgender Abspaltung und Reinigung hergestellt werden, wie dies z.B. von *Jonczyk und Meienhofer* (*Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Symp.*, Eds. V. Hruby und D.H.Rich, Pierce Comp. III, p. 73-77, 1983, oder *Angew. Chem.* 104, 1992, 375) oder gemäß Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.* 94, 1972, 3102) beschrieben wurde. Im übrigen können sie nach üblichen Methoden der Aminosäure- und Peptidsynthese hergestellt werden, wie dies z. B. aus Novabiochem – 1999 Catalog & Peptide Synthesis Handbook der Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-65796 Bad Soden, aus zahlreichen Standardwerken und

publizierten Patentanmeldungen bekannt ist. Biotinylierte oder fluoreszenzmarkierte Peptide / Proteine können ebenfalls nach Standardmethoden hergestellt werden. (z.B. E.A. Bayer and M. Wilchek in Methods of Biochemical Analysis Vol 26 The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology; und Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6<sup>th</sup> Edition, 1996, by R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc.; oder auch WO 97/14716)

Selbstverständlich können die erfindungsgemäßen Peptide der Formeln I – VI  
10 auch durch Solvolyse, insbesondere Hydrolyse, oder durch Hydrogenolyse ihrer funktionellen Derivate freigesetzt werden. Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxygruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das 15 mit einem N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe oder die anstelle des H-Atoms einer Hydroxygruppe eine Hydroxyschutzgruppe tragen.  
Entsprechendes gilt für Carbonsäuren, die durch Substitution ihrer –CO-OH Hydroxyfunktion mittels einer Schutzgruppe, z.B. als Ester geschützt werden können.

20 Der Ausdruck "Aminoschutzgruppe" ist allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Aminogruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen (zu blockieren), die aber leicht entfernbare sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt 25 worden ist. Der Ausdruck "Hydroxyschutzgruppe" ist ebenfalls allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Hydroxygruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen, die aber leicht entfernbare sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Das In-Freiheit-Setzen der Verbindungen aus ihren funktionellen Derivaten gelingt - je nach der benutzten Schutzgruppe - z. B. mit starken Säuren, zweckmäßig mit TFA oder Perchlorsäure, aber auch mit anderen starken anorganischen Säuren wie Salzsäure oder Schwefelsäure, starken organischen Carbonsäuren wie Trichloressigsäure oder Sulfonsäuren wie

Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure. Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen (z. B. CBZ oder Benzyl) können z. B. durch Behandeln mit Wasserstoff in Gegenwart eines Katalysators (z. B. eines Edelmetallkatalysators wie Palladium, zweckmäßig auf einem Träger wie Kohle) abgespalten werden. Die

5 Verfahrensdurchführungen sind allgemein bekannt und sollen hier nicht weiter beschrieben werden.

Wie bereits erwähnt, umfassen die erfindungsgemäßen Peptide ihre physiologisch unbedenklichen Salze, welche ebenfalls nach Standardmethoden

10 hergestellt werden können. So kann eine Base der Formel I mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden, beispielsweise durch Umsetzung äquivalenter Mengen der Base und der Säure in einem inerten Lösungsmittel wie Ethanol und anschließendes Eindampfen. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch 15 unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische ein- 20 oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Gluconsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2- 25 Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalinmono- und Disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und /oder Aufreinigung der erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden. Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in einer ihrer 30 physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z. B. die Dimethyl-, Diethyl- oder Diisopropyl-ammoniumsalze, Monoethanol-,

Diethanol- oder Diisopropylammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexyl-ammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z. B. Salze mit Arginin oder Lysin.

- 5 Die erfindungsgemäßen peptidischen Verbindungen können, wie bereits erwähnt, als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen bei denen epitheliale Zellen beteiligt sind. Besonders hervorzuheben sind hierbei Erkrankungen oder Entzündungen oder
- 10 Wundheilungsprozesse der Haut, der Atemwegorgane und des Magen- und Darmbereichs, so zum Beispiel Apoplexie, Angina pectoris, Tumorerkrankungen, osteolytischen Krankheiten wie Osteoporose, pathologisch angiogenen Krankheiten wie z. B. Entzündungen, Lungenfibrose, ophthalmologischen Krankheiten, diabetischer Retinopathie, makularer Degeneration, Myopia, okularer
- 15 Histoplasmose, rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, rubeotischem Glaukom, ulcerativer Colitis, Morbus Crohn, Atherosklerose, Psoriasis, Restenose nach Angioplastie, bei akutem Nierenversagen oder Nierenentzündung.

Gegenstand der Erfindung sind demgemäß peptidische Verbindungen der oben  
20 und unten sowie in den Ansprüchen definierten Formeln einschließlich ihrer physiologisch unbedenklichen Salze als Arzneimittel, Diagnostika oder Reagenzien.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere entsprechende Arzneimittel als  
25 Inhibitoren zur Bekämpfung von Erkrankungen, die mittelbar oder unmittelbar auf einer Expression des  $\alpha_v\beta_6$  –Integrinrezeptors beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen, Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.

30 Gegenstand sind auch entsprechende pharmazeutische Zubereitungen, welche mindestens ein Arzneimittel der Formeln I bis VI sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe enthalten.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung der peptidischen Verbindungen und/oder ihre physiologisch unbedenklichen Salze gemäß der Ansprüche und der Beschreibung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die mittelbar oder unmittelbar auf einer

5 Expression des  $\alpha_v\beta_6$  –Integrinrezeptors beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen, Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel bzw. sie enthaltende pharmazeutische

10 Zubereitungen können in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale), parenterale, topische Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalation-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser, pflanzliche Öle,

15 Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Pulver, Granulate, Sirupe, Säfte oder Tropfen, zur rektalen Anwendung Suppositorien, zur parenteralen Anwendung Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige

20 Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, für die topische Anwendung Salben, Cremes oder Puder. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-,

25 Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farb-, Geschmacks- und /oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z. B. ein oder mehrere Vitamine. Für die Applikation als Inhalationsspray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder

30 Treibgasgemisch (z. B. CO<sub>2</sub> oder Fluorchlorkohlenwasserstoffen) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch verträgliche Lösungsmittel zugegen

sein können, z. B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Substanzen können in der Regel in Analogie zu anderen  
5 bekannten, im Handel befindlichen Peptiden (z.B. beschrieben in der US-A-4 472  
305 ) verabreicht werden, vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,05 und  
500 mg, insbesondere zwischen 0,5 und 100 mg pro Dosierungseinheit  
verabreicht. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,01 und  
10 20 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für jeden Patienten hängt jedoch  
von den verschiedensten Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der  
eingesetzten speziellen Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen  
Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabreichungszeitpunkt  
und -weg, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und  
Schwere der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die parenterale  
15 Applikation ist bevorzugt.

Die Erfindung umfaßt schließlich auch rekombinante DNA-Sequenzen, welche  
Abschnitte enthalten, die für Peptidbereiche codieren, die die erfindungsgemäßen  
peptidischen Strukturmotive der Formeln I bis VI aufweisen.

20 Solche DNA kann durch Partikel auf Zellen übertragen werden, wie in Ch. Andree  
et al. Proc.Natl.Acad.Sci. 91, 12188-12192 (1994) beschrieben ist, oder der  
Transfer auf Zellen kann durch andere Hilfsmittel, wie Liposomen, gesteigert  
werden (A.I. Aronsohn and J.A. Hughes J. Drug Targeting, 5, 163-169 (1997)).

25 Der Transfer einer solchen DNA könnte demnach in Hefen, mittels Bacculo-Viren  
oder in Säugerzellen für die Produktion der peptidischen Substanzen dieser  
Erfindung benutzt werden.

30 Wird ein tierischer oder menschlicher Organismus mit solch einer rekombinante  
DNA infiziert, dann können die durch die infizierten Zellen letztlich selbst  
gebildeten erfindungsgemäßen Peptide unmittelbar an den  $\alpha_v\beta_6$  –  
Integrinrezeptor, beispielsweise von Tumorzellen binden und ihn blockieren.

Entsprechende rekombinante DNA, die durch bekannte und übliche Techniken bereitgestellt werden kann, kann beispielsweise aber auch in Form von Virus-DNA vorliegen, welche Abschnitte enthält, die für das Virus-Hüllprotein codieren. Durch Infektion eines Wirtsorganismus mit derartigen rekombinanten,,

5 vorzugsweise nicht pathogenen Viren, können Wirtszellen, die das Integrit  $\alpha_v\beta_6$  exprimieren, bevorzugt angegriffen werden (Targetierung).

Geeignete Viren sind beispielsweise Adenovirenarten, die mehrfach schon als Vektoren für fremde Gene in Säugerzellen benutzt wurden. Eine Anzahl von

10 Eigenschaften machen sie zu guten Kandidaten für Gentherapie, wie S.J. Watkins et al. Gene Therapy 4, 1004-1012 (1997) zu entnehmen ist (siehe auch J. Engelhardt et al. Hum. Gene Ther. 4, 759-769 (1993)).

Wie in A. Fasbender et al. J.Clin.Invest. 102, 184-193 (1998) zu finden ist, sind gemeinsames Problem bei Gentherapie durch virale und nichtvirale Vektoren die 15 limitierte Effizienz des Gentransfers. Mit der oben beschriebenen zusätzlichen Ligandensequenz für  $\alpha_v\beta_6$  Integrit im Hüllprotein der Adenoviren kann eine Verbesserung des Transfers z.B. von Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) cDNA erreicht werden.

20 Ähnlich wie in der Arbeit von T. Tanaka et al. Cancer Research 58, 3362-3369 (1998) kann statt der DNA für Angiostatin auch die DNA für die Sequenzen dieser Erfindung für Zelltransfektionen mittels retroviraler oder adenoviraler Vektoren genutzt werden.

25 Die erfindungsgemäßen Peptide können auch innerhalb eines Liposomenkomplexes aus Lipid/Peptid/DNA für eine Transfektion von Zellkulturen herstellt zusammen mit einem Liposomen-Komplex bestehend aus Lipid/DNA (ohne Peptid) für den Einsatz in der Gentherapie am Menschen eingesetzt werden. Die Herstellung eines Liposomenkomplexes aus

30 Lipid/DNA/Peptid ist beispielsweise bei Hart S.L, et al 1998: Lipid-Mediated Enhancement of Transfection by a Non-Viral Integrin-Targeting Vector. Human Gene Therapy 9, 575-585, beschrieben.

Ein Liposomenkomplex aus Lipid/Pepid/DNA ist beispielsweise aus folgenden Stammlösungen herstellbar:

1 µg/µl Lipofectin (äquimolare Mischung aus DOTMA (= N-[1-(2,3-dioleyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium Chlorid ) und DOPE (Dioleyl Phosphatidylethanolamin)), 10 µg/ml Plasmid DNA und 100 µg/ml Peptid.

5 Sowohl DNA als auch Peptid werden dazu in Zellkulturmedium gelöst. Der Liposomenkomplex wird durch Mischen der drei Komponenten in einem bestimmten Gewichtsverhältnis (Lipid: DNA: Peptid, z.B. 0,75 : 1 : 4) hergestellt. Liposomen DNA-Komplexe für eine Gentherapie am Menschen sind bereits 10 beschrieben worden (Caplen N.J., et al 1995: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis Nature Medicine 1, 39-46).

Gegenstand der Erfindung ist somit auch die Verwendung entsprechend 15 modifizierter rekombinanter DNA von Gen-freisetzenden Systemen, insbesondere Virus-DNA, zur Bekämpfung von Krankheiten welche mittelbar oder unmittelbar auf einer Expression von  $\alpha_v\beta_6$  –Integrinrezeptoren beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen, 20 Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.

Die neuen erfindungsgemäßen Verbindungen können auch als Integrinliganden zur Herstellung von Säulen für die Affinitätschromatographie zur Reindarstellung von Integrinen verwendet werden. Der Komplex aus einem Avidin-derivatisierten 25 Trägermaterial, z.B. Sepharose und den neuen Verbindungen der Formel I wird nach an sich bekannten Methoden (z.B. E.A. Bayer and M. Wilchek in Methods of Biochemical Analysis Vol 26 The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biologygebildet. Als polymere Trägermaterialien eignen sich dabei die an sich in der Peptidchemie bekannten polymeren festen Phasen mit 30 vorzugsweise hydrophilen Eigenschaften, beispielsweise quervernetzte Polyzucker wie Cellulose, Sepharose oder Sephadex<sup>R</sup>, Acrylamide, Polymer auf Polyethylenglykolbasis oder Tentakelpolymeren<sup>R</sup>.

Beispiel 1

*Herstellung und Aufreinigung erfindungsgemäßer Peptide:*

Prinzipiell erfolgte die Herstellung und Aufreinigung mittels Fmoc-Strategie unter Protektion säurelabiler Seitenketten auf särelabilen Harzen unter Benutzung eines kommerziell erhältlichen "continuous flow" Peptidsynthesizers

5 entsprechend den Angaben von Haubner et al. (J. Am. Chem. Soc. 118, 1996, 17703).

Exemplarisch wird im folgenden die Synthese und Aufreinigung für das Peptidamid Ac-RTDLDLSR-NH<sub>2</sub> beschrieben. Für die Synthese von Peptidsäuren wurde ein o-Chlortriylchlorid-Harz (Novabiochem) nach 10 Herstellerangaben mit der entsprechenden C-terminalen Fmoc-Aminosäure belegt und im Synthesegerät entsprechend den Herstellerangaben (Milligen) verwendet. Die prinzipiellen Schritte sind Waschen - Fmoc-Schutzgruppe abspalten – Waschen – Kupplung mit der nächsten Fmoc-Aminosäure – Capping (Acetylierung) – Waschen. Ist eine N-terminale Acylierung nach letzter

15 Aminosäurekupplung erwünscht, so erfolgt diese nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe mit dem entsprechenden aktivierten Acylrest, z.B. dem Essigsäureanhydrid.

2 g 9-Fmoc-Aminoxanthenyloxy-Harz (Novabiochem, 0.37 mmol/g) wurden nacheinander mit je 0.45 g Hydroxybenzotriazol Hydrat (HOBr), 0.5 ml Ethyl-

20 diisopropylamin, je 4 Äquivalenten Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Fmoc-Aminosäure in Dimethylformamid (DMF), in einem kommerziellen Synthesegerät und einer typischen Prozedur (Gerät und Handbuch Milligen 9050

PepSynthesizer™, 1987), für jeweils 60 min, einem Kupplungsschritt unterworfen. Waschschritte erfolgten in DMF für 10 min, Abspaltungsschritte in

25 Piperidin/DMF (1:4 vol) für 5 min, N-terminale Acetylierungen (Capping) wurden mit Essigsäureanhydrid/Pyridin/DMF (2:3:15 vol) für 15 min durchgeführt. Es kamen die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pmc), danach Fmoc-Leu, danach Fmoc-Ser(But), danach Fmoc-Asp(Obut), danach Fmoc-Leu, Danach Fmoc-Asp(Obut), danach Fmoc-Thr(But), und schließlich Fmoc-Arg(Pmc)) zum Einsatz.

30 Nach Waschen mit DMF und Isopropanol und folgender Trocknung am Vakuum wurden 3.48 g des N-terminal acetylierten Peptidyl-Harzes, Ac-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(Obut)-Leu-Asp(Obut)-Ser(But)-Leu-Arg(Pmc)-Aminoxanthenyloxy-Harz erhalten.

Durch Behandlung dieses Peptidylharzes mit Trifluoressigsäure / Anisol / Dichlormethan (74 ml / 3.7 ml / 74 ml) für 4 h bei Raumtemperatur, Filtration, Einengen am Vakuum und Verreiben mit Diethylether konnte ein Niederschlag von 0.6 g Peptid, Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, erhalten werden.

5 Eine Reinigung des Produktes erfolgte per RP-HPLC auf Lichrosorb RP18 (250-25, 7 um, Merck KGaA) in 0.3% TFA mit einem Gradienten von 4% auf 24% 2-Propanol in 2 h bei 8 ml/min und Beurteilung mittels UV-Durchflussphotometer bei 215 nm.

Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Das erhaltene

10 Produkt entsprach nach FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy) den Erwartungen: C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub>M 1015,5 g/mol; (M+H)<sup>+</sup> ist 1016.

Das gereinigte Produkt Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> hat in der analytischen HPLC auf Superspher RP18e (250-4, Merck KGaA) bei einem Gradienten von 0-99 % A (0.08 m Phosphat pH 3.5, 15 % Acetonitril) nach B

15 (0.03 m Phosphat pH 3.5, 70% Acetonitril) in 50 min, bei 1ml/min, und Detektion bei 215 nm, eine Retentionszeit von 7.22 min.

Weitere HPLC-Analysen erfolgten in den beiden folgenden Systemen:

20 **System A:** 0,3% Trifluoressigsäure mit einem Gradienten von 0 – 80% 2-Propanol in 50 min auf LichroSpher 60 RP-Select B<sup>®</sup> (250-4) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), bei 1 ml/ min, und Detektion bei 215 nm.

**System B:** 0,1% Trifluoressigsäure mit einem Gradienten von 30 – 70% Acetonitril in 50 min auf SuperSpher 100 RP18e<sup>®</sup> (250-4) (Merck KGaA,

25 Darmstadt, Germany), bei 1 ml/ min und Detektion bei 215 nm.

## Beispiel 2

Analog Beispiel 1 wurden folgende in Tabelle 1 wiedergegebene Peptide hergestellt und gereinigt.

Tab.1:

Struktur	MW (g/mol)	FAB-MS [M+H] gefunden	Rt (HPLC) / min (System A)	Rt (HPLC) / min (System A)
RTDLDLRLTYTL	1453,6	1456	21,9	
DSLRTYTL	968,1	969	18,6	
RTDLDLSL	818,9	820	18,6	23,6
DLDLSLRTY	982,1	983	16,6	
RTDLDLSLR	975,1	975	13,5	
RTDLDLRLTY	1239,3	1239	16,6	
Ac-RTDLDLSLR	1118,2	1119	16,2	15,6
RTDLDLRLT	1076,2	1076	13,9	
RTDLPSLRTY	1221,4	1221	19,2	
RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	988,1	989	13,4	
Ac- RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	1030,2	1031	15,3	
RTDLYYLMDL	1302,5	1302		28,2
RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	1075,2	1076	11,1	13,8
RTDLDPLRTY	1249,4	1250	16,3	
RTDLYYLRTY	1363,5	1363		11,5
Ac-RTDLDLSLR-NH <sub>2</sub>	1117,2	1118	13,2	15,0
Ac-RTDLDLSLR-NH <sub>2</sub>	1015,5	1016	siehe Beispiel 1	
TDLDLRLT	920,0	920		14,8
PVDLYYLMDL	1241,5	1241	36,1	

Als Vergleichsverbindungen dienten bekannte RGD-Peptide wie GRGDSPK, zyklo-(RGDfV), sowie das lineare Peptid DLYYLMDL.

### Beispiel 3

#### *Herstellung einer $\alpha_v\beta_6$ -Integrin Präparation:*

$\alpha_v\beta_6$  wurde in löslicher transmembraner verkürzter Form (Weinacker et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 6940) aus einem Baculovirus Expressionssystem gemäß für <sup>10</sup>  $\alpha_v\beta_3$  bekannter Rekombinationstechniken (Metha et al., 1998, Biochem. J. 330, 861) unter Verwendung von 14D9.F8 Antikörper-Affinitätschromatographie (Mitjans et al., 1995, J Cell Sci. 108, 2825) gewonnen und gereinigt. Humane  $\alpha_v$  und  $\beta_6$  cDNA Klone sind generell bekannt und allgemein zugänglich. Der Transfervektor pAcUW31 (Clontech Lab. Inc., USA), der eine gleichzeitige <sup>15</sup> Expression von zwei unterschiedlichen Ziel- cDNAs erlaubt, wurde eingesetzt,

um transmembranes verkürztes  $\alpha_v\beta_6$  aus rekombinanten Baculovirus-Zellen zu exprimieren. Dazu wurde ein  $\alpha_v$  Transfervektor hergestellt und transmembranes verkürztes ( $\Delta TM$ )  $\alpha_v$  aus dem Plasmid  $\alpha_v\Delta TM(pBAC9)$  unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI herausgeschnitten (Mehta et al., Lit. s. o.)

5 und mittels "blunt-end" Ligation in die BamHI Schnittstelle von pAcUW31 "downstream" des Polyhedrin Promotors einkloniert. Transmembrane verkürzte  $\beta_6$  cDNA wurde aus dem Plasmid pCDNAneo $\beta_6$  (Weinacker at al., Lit. s. o.) unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI herausgeschnitten und ebenfalls mittels "blunt-end" Ligation in die BamHI Schnittstelle von pAcUW31

10 "downstream" des Polyhedrin Promotors einkloniert. Die verkürztes  $\alpha_v$  und  $\beta_6$  enthaltenden Tandem-Vektoren wurden verwendet, um rekombinantes Baculovirus (Mehta et al., Lit. s. o.) zu erhalten. Die rekombinanten Baculoviren wurden eingesetzt, um "High Five"- Insektenzellen zu infizieren. Der lösliche Rezeptor wurde nach 48-71 stündiger Kultivierung gewonnen, in dem man den

15 Überstand der Zellkultur über Affinitätssäulen der oben angegebenen Art führte und bei pH 3,1 eluierte. Alle Verfahrensschritte wurden bei Raumtemperatur und in Abwesenheit jeglicher Detergentien ausgeführt. Die Peakfraktionen wurden neutralisiert, konzentriert und bei 4°C dialysiert und schließlich bei -80°C aufbewahrt. Der so erhaltene rekombinante lösliche humane Rezeptor ist

20 biologisch aktiv und behält seine Liganden-Spezifität.

Eine ähnliche für lösliches  $\alpha_v\beta_3$  angewandte Herstellungsmethode wurde in der EP 0846 702 beschrieben.

#### **Beispiel 4:**

25  $\alpha_v\beta_6$  / Fibronektin Rezeptorbindungstest:

Die hergestellten erfindungsgemäßen Peptide wurden in Lösung zusammen mit kompetitiv wirkenden Fibronectin an den immobilisierten  $\alpha_v\beta_6$  Rezeptor gebunden und der Q-Wert als Maß für die Selektivität der Bindung des zu testenden Peptids an  $\alpha_v\beta_6$  ermittelt. Der Q-Wert berechnet sich dabei aus dem

30 Quotienten der IC<sub>50</sub>-Werte von Testpeptid und einem Standard. Als Standard diente das lineare Hepta-RGD-Peptid GRGDSPK (Lit./Patent vgl Pytela et al. Science 231, 1559, (1986)).

Der Bindungstest wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt:

Die Immobilisierung von löslichem  $\alpha_v\beta_6$  Rezeptor auf Microtitterplatten erfolgte durch Verdünnung der Proteinlösung in TBS++ und anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C (100 µl/Vertiefung). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation (2 h, 37°C) mit 3% (w/v) BSA in TBS++ (200 µl/Vertiefung)

5 blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges Waschen mit TBSA++ entfernt. Peptide wurden seriell (1:10) in TBSA++ verdünnt und zusammen mit biotinyliertem Fibronectin (2 µg/ml) mit dem immobilisierten Integrin inkubiert (50 µl Peptid + 50 µl Ligand pro Vertiefung; 2 h; 37°C). Nicht gebundenes Fibronectin und Peptide wurden durch dreimaliges Waschen mit TBSA++ entfernt. Die

10 Detektion des gebundenen Fibronectin erfolgte durch Inkubation (1 h; 37°C) mit einem alkalische-Phosphatase-gekoppelten anti-Biotin-Antikörper (Biorad) (1:20000 in TBSA++; 100 µl/Vertiefung). Nach dreimaligem Waschen mit TBSA++ erfolgte die kolorimetrische Detektion durch Inkubation (10-15 min; 25°C, im Dunkeln) mit Substratlösung (5 mg Nitrophenylphosphat, 1 ml

15 Ethanolamin, 4 ml H<sub>2</sub>O; 100 µl/Vertiefung). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,4 M NaOH (100 µl/Vertiefung) gestoppt. Die Farbintensität wurde bei 405 nm im ELISA-Meßgerät bestimmt und gegen den Nullwert abgeglichen. Als Nullwert dienten Vertiefungen, die nicht mit Rezeptor beschichtet waren. Als Standard wurde GRGDSPK eingesetzt. Die IC<sub>50</sub>-Werte für die getesteten Peptide

20 wurden aus einer Graphik abgelesen und daraus zusammen mit dem IC<sub>50</sub>-Wert des Standardpeptids der Q-Wert des erfindungsgemäßen Peptids ermittelt. Die Ergebnisse des beschriebenen Tests sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 2

Struktur	Q-Wert = $\frac{IC_{50} \text{ Testpeptid}}{IC_{50} \text{ Standardpeptid}}$
GRGDSPK	1,0 ( $IC_{50} = 400 \text{ nM}$ )
zyklo-(RGDFV)	0,6
DLYYLMDL	Inaktiv ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ )
RTDLDLSRTYTL	0,27
DSLRTYTL	inaktiv ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ )
RRDLDLSL	2,5
DLDLSRTY	inaktiv ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ )
RTDLDLSLR	0,17
RTDLDLSRTY	0,10
Ac-RTDLDLSRT	0,029
RTDLDLSRT	0,11
RTDLDLRT-NH <sub>2</sub>	1,1
Ac-RTDLDLRT-NH <sub>2</sub>	0,5
RTDLYYLMDL	0,33
RTDLDLSLRT-NH <sub>2</sub>	0,056
RTDLDPLRTY	0,50
RTDLYYLRTY	0,042
Ac-RTDLDLSLRT-NH <sub>2</sub>	0,013
TDLDLSRT	66
PVDLYYLMDL	inaktiv ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ )

Q-Werte kleiner 1 bedeuten, daß sie eine relativ bessere Bindung zum Rezeptor aufweisen, als vergleichsweise das Standardpeptid, welches absolut gesehen,

5 bereits eine gute Bindung im Wettbewerb mit dem natürlichen Liganden Fibronectin besitzt.

### Beispiel 5

Analog des vorangehenden Beispiels wurden zu Vergleichszwecken Integrin-

10 Liganden Bindungstest mit unterschiedlichen Integrinen (z.B.  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ) und ihren entsprechenden Liganden (z.B. Vitronectin, Fibrinogen) durchgeführt.

**Beispiel 6:**

Allgemeine Herstellung eines DNA-Liposom-Komplexes und Anwendung für die Gentherapie:

Man mischt Lipid und DNA im Gewichtsverhältnis 5:1 (Lipid:DNA) in Krebs-  
5 HEPES-Lösung ( 140mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> , 6 mM KCl, 10mM  
HEPES, 10 mM D-Glucose; pH 9,0). Dabei beträgt die Einzeldosis 30 µg  
DNA/200 µl. 200 µl dieses Lipid-DNA-Komplexes werden mit einen  
Pumpzerstäuber auf des Nasenepithel aufgebracht. Das wird 10 mal im Abstand  
von 15 min wiederholt. Die Gesamtdosis DNA beträgt 300 µg.

10

Die nachfolgenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen:

**Beispiel A: Injektionsgläser**

Eine Lösung von 100 g eines Wirkstoffes der Formel I und 5 g Dinatriumhydro-  
genphosphat werden in 3 l zweifach destilliertem Wasser mit 2 n Salzsäure auf  
pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen  
Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält  
5 mg Wirkstoff.

20

**Beispiel B: Suppositorien**

Man schmilzt ein Gemisch von 20 g eines Wirkstoffes der Formel I mit 100 g  
Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und lässt erkalten. Jedes  
Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

25

**Beispiel C: Lösung**

Man bereitet eine Lösung aus 1 g eines Wirkstoffes der Formel I, 9,38 g  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 28,48 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  und 0,1 g Benzalkoniumchlorid  
in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf  
und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen  
30 verwendet werden.

**Beispiel D: Salbe**

Man mischt 500 mg eines Wirkstoffes der Formel I mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

5

**Beispiel E: Tabletten**

Ein Gemisch von 1 kg Wirkstoff der Formel I, 4 kg Lactose, 1,2 kg Kartoffelstärke, 0,2 kg Talk und 0,1 kg Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten verpreßt, derart, daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

10

**Beispiel F: Dragees**

Analog Beispiel E werden Tabletten gepreßt, die anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Kartoffelstärke, Talk, Tragant und Farbstoff überzogen werden.

15

**Beispiel G: Kapseln**

2 kg Wirkstoff der Formel I werden in üblicher Weise in Hartgelatinekapseln gefüllt, so daß jede Kapsel 20 mg des Wirkstoffs enthält.

20

**Beispiel H: Ampullen**

Eine Lösung von 1 kg Wirkstoff der Formel I in 60 l zweifach destilliertem Wasser wird steril filtriert, in Ampullen abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jede Ampulle enthält 10 mg Wirkstoff.

25

**Beispiel I: Inhalations-Spray**

Man löst 14 g Wirkstoff der Formel I in 10 l isotonischer NaCl-Lösung und füllt die Lösung in handelsübliche Sprühgefäße mit Pump-Mechanismus. Die Lösung kann in Mund oder Nase gesprüht werden. Ein Sprühstoß (etwa 0,1 ml) entspricht einer Dosis von etwa 0,14 mg.

### Patentansprüche

1. Peptidische Verbindungen der Formel I



worin bedeuten:

10         $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6$  jeweils unabhängig voneinander einen Aminosäurerest, wobei die Aminosäuren unabhängig voneinander ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, Phe, His, Ile, Leu, Lys, Met, Nle, homo-Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr oder Val, und die genannten Aminosäuren auch derivatisiert sein können,

15         $W^1$ ,              H oder Ac

W<sup>2</sup>              OH, OR, NHR, NR<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>,

R              Alkyl mit 1-6 C-Atomen und

n, m              jeweils unabhängig voneinander eine Zahl von 0 – 15.

2. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin X<sup>2</sup> einen

20        Aminosäurerest darstellt, der ausgewählt aus der Gruppe Thr, Ser, Asp oder Glycin, ist.

3. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin X<sup>3</sup> ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe Asp, Glu, Arg, Lys, His oder Tyr ist.

25        4. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin X<sup>4</sup> ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe Ser, Tyr, Thr, Gly oder Val ist.

30        5. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1 gemäß der Formel V



mit den in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen.

6. Peptidische Verbindung nach Anspruch 5 gemäß der Formel VI



5 7. Peptidische Verbindungen der Formel I oder II gemäß der Ansprüche 1 bis  
6 sowie ihrer physiologisch unbedenklichen Salze als Arzneimittel.

10 8. Arzneimittel nach Anspruch 7 als Inhibitor zur Bekämpfung von  
Erkrankungen, die auf einer Expression und pathologischen Funktion von  
 $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren beruhen.

15 9. Arzneimittel nach Anspruch 8 zur Bekämpfung von Thrombosen,  
Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren,  
Osteoporose, Fibrosen, Entzündungen, Infektionen, Psoriasis sowie zur  
Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.

20 10. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Arzneimittel  
gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9 sowie gegebenenfalls Träger-  
und/oder Hilfsstoffe und gegebenenfalls andere Wirkstoffe.

25 11. Verwendung von peptidischen Verbindungen gemäß der Ansprüche 1  
bis 6 und/oder ihre physiologisch unbedenklichen Salze zur Herstellung  
eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die auf einer  
Expression und pathologischen Funktion von  $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren  
beruhen.

30 12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur  
Bekämpfung von Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen,  
Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Fibrosen, Entzündungen,  
Infektionen, Psoriasis sowie zur Beeinflussung von  
Wundheilungsprozessen.

13. Rekombinante DNA, enthaltend eine Sequenz, welche für einen Peptidabschnitt codiert, der einer peptidischen Verbindung der Ansprüche 1 - 6 entspricht.
- 5 14. Rekombinante Virus-DNA nach Anspruch 13.
15. Virus, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Hüllprotein besitzt, welches eine Sequenz aufweist, die einer peptidischen Verbindung der Ansprüche 1 – 6 entspricht.
- 10 16. Verwendung eines Virus nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die auf einer Expression und pathologischen Funktion von  $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren beruhen.

15

## Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt neuartige Peptide, welche als Liganden des Integrins  
5  $\alpha_v\beta_6$  biologisch wirksam sind. Diese Peptide weisen alle ein gemeinsames  
Strukturmotiv, nämlich – **Asp Leu Xaa Xaa Leu** – , bzw. in einer bevorzugten  
Form – **Arg Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu Arg** – auf, wobei Xaa für einen  
beliebigen Aminosäurerest steht. Die erfindungsgemäßen Peptide können als  
wirksame Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_6$  Integrin-Rezeptors und somit zur Behandlung  
10 verschiedener Krankheiten und pathologischer Befunde eingesetzt werden.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**